

⑫ 特許公報 (B2) 昭58-30537

⑬ Int.Cl.³G 01 N 27/46
27/30
33/18

識別記号

府内整理番号
7363-2G
7363-2G
6514-2G⑭⑮公告 昭和58年(1983)6月29日
発明の数 1

(全7頁)

1

⑯生物化学的酸素要求量測定方法

⑰特 願 昭51-121942

⑱出 願 昭51(1976)10月13日

⑲公 開 昭53-47895

⑳昭53(1978)4月28日

㉑發 明 者 鈴木 周一

東京都豊島区巣鴨1丁目40番6号

㉒發 明 者 軽部 征夫

立川市富士見町4丁目11番18号

㉓出 願 人 味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目5番8号

㉔代 理 人 弁理士 相良 省三

(公害防止関連技術)

㉕引用文献

米国特許 3510407 (U.S., A)

㉖特許請求の範囲

1 有機物を資化し酸素を消費する微生物をその生理活性を維持させたまま膜状担体に固定化して得られる固定化微生物膜を酸素電極の隔膜上に取り付けてなる微生物電極を被験液に接触せしめ、溶存酸素の減少量を測定し、溶存酸素の減少量と生物化学的酸素要求量との間の比例関係を利用して生物化学的酸素要求量を求ることを特徴とする生物化学的酸素要求量測定方法。

㉗発明の詳細な説明

本発明は生物化学的酸素要求量(以下BODといふ)をきわめて簡易に測定する方法に関するものである。更に詳細には有機物を資化し、酸素を消費する微生物を固定化し、これを酸素電極の隔膜上に取り付けてなる微生物電極を有機物を含有する排水(被験液)に浸漬し、溶存酸素の減少量を電流(又は電圧)として測定する簡易なBOD測定に関するものである。

近年、各種工業の急速な発展に伴つて工場などから排出される排水による環境汚染が社会的に大

きな問題となつてゐる。そして昭和45年4月には「水質汚濁に係る環境基準」が閣議決定され、河川、湖沼、などの環境汚染の各種水質項目のうち、総合的汚濁指標の1つであるBODの測定は排水基準の重要な項目となつたのである。

現在BODの測定法としては日本工業規格(工業排水試験方法JISK0102-1972)で詳細に決められているが、この方法は、排水を20℃で5日間静置後その溶存酸素の減少を測定せねばならないため、規準内排水の決定には5日間必要とされその測定結果が判明するまでその間排水を厳密にそのまま貯留せねばならず、又、測定BOD範囲が極めて狭く、原水の稀釈に困難さがあるとともに、測定の精度を上げる為には、測定者の熟練を要しなければならず、又、バッチ式であるために自動化が不可能であるなどきわめてはん雑にして欠点が多い。

そこで自動化を目的として、改良装置が考案されている(PPM vol. 2468 日本工業新聞社刊14-25ページ)が、これらの装置においても測定に半日以上要するとともに、原水中に一定の微生物を測定の都度、植種せねばならないなど多くの手間を要するという欠点を有している。

㉘ 本発明者らは、このようにはん雑にして欠点の多いBODの測定について、簡便且つ容易に測定できるようにするために種々の研究を行なつた結果、微生物を膜状に固定化した固定化微生物膜を酸素電極に取り付けてなる微生物電極を排水に接触せしめた際の溶存酸素の減少量とBODとの間に相関関係があることを見出し本発明に到達した。

本発明は有機物を資化し酸素を消費する微生物をその生理活性を維持させたまま膜状担体に固定化して得られる固定化微生物膜を酸素電極の隔膜上に取り付けてなる微生物電極を被験液に接触せしめ、溶存酸素の減少量を測定し、溶存酸素の減少量と生物化学的酸素要求量との間の比例関係を

2

5 排水基準の重要な項目となつたのである。

現在BODの測定法としては日本工業規格(工業排水試験方法JISK0102-1972)で詳細に決められているが、この方法は、排水を20℃で5日間静置後その溶存酸素の減少を測定せねばならないため、規準内排水の決定には5日間必要とされその測定結果が判明するまでその間排水を厳密にそのまま貯留せねばならず、又、測定BOD範囲が極めて狭く、原水の稀釈に困難さがあるとともに、測定の精度を上げる為には、測定者の熟練を要しなければならず、又、バッチ式であるために自動化が不可能であるなどきわめてはん雑にして欠点が多い。

そこで自動化を目的として、改良装置が考案されている(PPM vol. 2468 日本工業新聞社刊14-25ページ)が、これらの装置においても測定に半日以上要するとともに、原水中に一定の微生物を測定の都度、植種せねばならないなどまだ多くの手間を要するという欠点を有している。

㉙ 本発明者らは、このようにはん雑にして欠点の多いBODの測定について、簡便且つ容易に測定できるようにするために種々の研究を行なつた結果、微生物を膜状に固定化した固定化微生物膜を酸素電極に取り付けてなる微生物電極を排水に接触せしめた際の溶存酸素の減少量とBODとの間に相関関係があることを見出し本発明に到達した。

㉚ 本発明は有機物を資化し酸素を消費する微生物をその生理活性を維持させたまま膜状担体に固定化して得られる固定化微生物膜を酸素電極の隔膜上に取り付けてなる微生物電極を被験液に接触せしめ、溶存酸素の減少量を測定し、溶存酸素の減少量と生物化学的酸素要求量との間の比例関係を

を利用して生物化学的酸素要求量を求ることを特徴とする生物化学的酸素要求量測定方法を提供する。

本発明の微生物電極即ちBOD測定装置を用いれば、供試水中のBOD値を30分間以内の極めて短時間で測定できるとともに、BODの測定できうる範囲が広くかつ測定値の再現性、精度が良く、かつ微生物は固定化されているため極めて安定で、測定の都度菌を植種する必要はなく、長時間くり返し使用でき、従来法に比べて大きな長所を多く有している上、自動化も可能であるなど実際の利用に当つてその工業的効果はきわめて大きい。

本発明において使用する微生物は有機物を資化し酸素を消費する微生物から選択され、この能力を有するもので細菌、糸状菌、放線菌等の好気性菌が用いられる。使用する細菌の例としてはシードモナス・フルオレッセンス、バシルス・ズブチリス、レコードモナス・エルギノーザなどが、糸状菌の例としてはアスペルギルス・ニガー、リゾプス・ホルモセンシスなどが、また放線菌の例としてはストレプトミセス・グリセウスなどがあげられるが、これらは一例にすぎず一般には土壤や活性汚泥から得られる複合微生物が用いられる。

これら微生物を菌体の生育に適する培地で培養し、菌体の生育力の極めて強い対数増殖期内で集菌し、洗浄後、生理的食塩水などに懸濁し、次いで固定化する。固定化は周知の固定化剤、例えばポリアクリルアミド、コラーゲンなどを用いて周知の方法により膜状に固定化される。固定化微生物の設置位置は酸素電極隔膜上である。

第1図は本発明の微生物電極の一例であり、1は固定化微生物膜、2はテフロン(登録商標名)膜(酸素電極の隔膜)である。3は白金カソード、4は鉛アノード、5は水酸化カリウムの電解液である。

第2図は本発明の微生物電極を用いたBOD測定システムの一例であり、1は微生物電極、2は電流の増幅回路、3は記録計である。上記装置によつて測定された電流値から排水中の有機物含有量を測定する。第2図のシステムは本発明のBOD測定方法の原理を示すもので、実際の測定装置は簡略化され、携帯可能とされるため形状は著しく変形されるものである。

本発明方法によるBOD測定装置を用いてBODを測定するに際しては、排水中の有機物が固定化微生物に接触し、これによつて資化分解され、この際酸素が消費される。

- 5 検定に際しては試供排水中に空気を送り込みながら飽和酸素の状態でBODを測定する(第1図)。上記微生物電極を排水中に挿入すると排水中の有機物が固定化微生物によつて資化され、上記固定化微生物の近傍の酸素が減少し電流値は次第に減少する。固定化微生物によつて消費される酸素量は被検液中の有機物の濃度に依存し一定なので排水中の酸素の拡散量と固定化微生物によつて消費される酸素量との間に平衡が成立し一定電流が得られる。したがつて電流の減少量又は平衡電流値とBODとの関係をあらかじめ標準液で検定しておく、このBODと上記装置で得られる電流値と比較し、試供排水中のBODを算出することができる。

次に本発明を説明するために試験例を示す。
20 試験例 1

- 日本工業規格(JIS K 0102-1974)に規定された方法で得た土壤抽出液10mlをグルコース1%、ペプトン1%、肉エキス1%の組成の培地80mlに加え、30℃で24時間通気培養した後、遠心分離により集菌した湿菌体1gを1%コラーゲンフィブリル懸濁液(pH 4.0)100gと混合し、テフロン板上にキャステイングして20℃で乾燥した。乾燥微生物コラーゲン膜を0.1%グルタルアルデヒド溶液に1分間浸漬してなめし再び乾燥させた。この微生物膜を5cmに切断し酸素電極のテフロン板上に環ゴムで固定化して固定化微生物電極(BOD測定装置)を作製した。このように作製した固定化微生物電極を測定すべき溶液に入れ、電流値(平衡電流)を読みとることにより測定溶液中のBOD値を測定することができる。作製したBOD測定装置を用い、測定時間を測定した。標準排水として日本工業規格で定められているグルコース・グルタミン酸標準液(グルコース150mgおよびグルタミン酸150mgを1ℓの水に溶解したもの)を用い、これを稀釀し、BOD値として6ppm、16ppm、22ppm、のものをそれぞれ作り、各濃度について測定した。その結果は第3図に示される。

第3図においてAは6ppm、Bは16ppm、Cは22ppmの電流値を示している。第3図からわかるようにBOD6ppmから22ppmの間ににおいて20分間以内に電流値が一定値を示しこの結果から広い範囲にわたって20分間内でBOD値の測定が可能であることが判る。

試験例 2

試験例1で作製した装置を用い、測定した平衡電流値と日本工業規格によるBOD値との値を比較した。標準排水として試験例1で用いた標準水を各種濃度に稀釀して使用した。その結果の電流値とBODの関係は第4図に示される。本装置による測定電流値と従来法のBOD値とは明らかに比例関係があり、本装置が従来法と同様BOD値の測定に用いられることが判る。

試験例 3

試験例1で作製した装置を用いBOD測定のくり返し再使用性を検討した。標準水の10%溶液を用いてBOD値を1日3回、10日間にわたって測定したが、第5図から明らかのように各測定毎に電流値の変化は認められず、長期間の再使用が可能であることが示された。

試験例 4

試験例1で作製した装置を用い固定化微生物電極の保存安定性を測定した。電極を0.25Mグルコースを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に浸し3℃で3ヶ月間静置保存したが、表1に示したように測定BOD値にあまり変化は認められず、この微生物電極の保存安定性がきわめて良い事がわかつた。

表 1

微生物電極の保存安定性

日数	BOD(ppm)
0	16.5
20	17.0
40	16.7
60	16.2
90	16.0

試料液：標準液の10%溶液

35℃

以上記載した試験例に示されたように本発明方法によるBOD測定装置は試供排水のBOD値を30分間以内というきわめて短時間で測定できるとともに、BODの測定できうる範囲が広いなど

従来法に比較し、すぐれた長所を有しているうえ、自動化も可能であるなどきわめて工業的効果は大きいものがある。

次に本発明の実施例を示す。

5 実施例 1

土壤抽出液5mlをグルコース1%、ペプトン1%、肉エキス1%の組成の培地100mlに加え30℃で24時間通気培養した。遠心分離により集菌した湿菌体2gを1%コラーゲン・フィブリル液(pH4.0)100gと混合した後テフロン板上に展開して乾燥させた。この微生物含有コラーゲン膜を0.1%グルタルアルデヒド液中に2分間浸漬した後乾燥させた。これを4cm×4cmに切断し、酸素電極の隔膜上に固定化して微生物電極を作製した。これをアルコール醸酵工場の排水に入れ30分後電流値を読みとり、日本工業規格の測定法で得られたBOD値との相関関係を求めた。その結果は第6図に示されるが、これから明らかに本装置による電流値と日本工業規格の測定法の間には比例関係があり、測定された電流値を読みとることによりBODの値を算出することができる。またこの排水のBODと電流値の関係は試験例2で得られた標準液のBODと電流値の関係ときわめてよい一致を示していた。

25 実施例 2

と殺場排水施設の活性汚泥抽出液1mlをグルコース1%、ペプトン1%、肉エキス1%の組成の培地500mlで37℃で24時間通気培養した後、遠心分離により集菌した菌体を生理的食塩水1mlにけんかくし、この懸濁液1mlにアクリルアミドモノマー90mg、N,N'-メチレンビスアクリルアミドモノマー10mgを加え過硫酸カリウムを加えてテフロン板上で20℃で重合させて微生物含有ポリアクリルアミド膜を調製した。このアクリルアミド膜を4×4cmの女性用ナイロンストッキングでおおつて補強し、酸素電極の隔膜上に環ゴムで固定化し、第1図に示した装置を作成した。この作成した装置を用い、実際のと殺場排水を測定した。その結果を第7図に示したが、本装置の電流値と日本工業規格の測定値の間には比例関係があり電流値を読みとることによりBOD値を求めることができる。

40 実施例 3

実施例1と同様の装置を用い食品工場の排水の

BOD値を測定し、日本工業規格の測定法によるBOD値と比較した。その結果は第8図に示されるが、これから明らかのように両値には比例関係が明らかに認められ、電流値から実際の排水BOD値を容易に測定できることがわかつた。

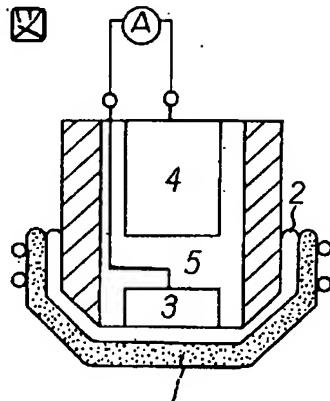
図面の簡単な説明

第1図は本発明の微生物電極の一例を示す説明図である。第2図は本発明の微生物電極を用いたBOD測定システムの一例を示す説明図である。

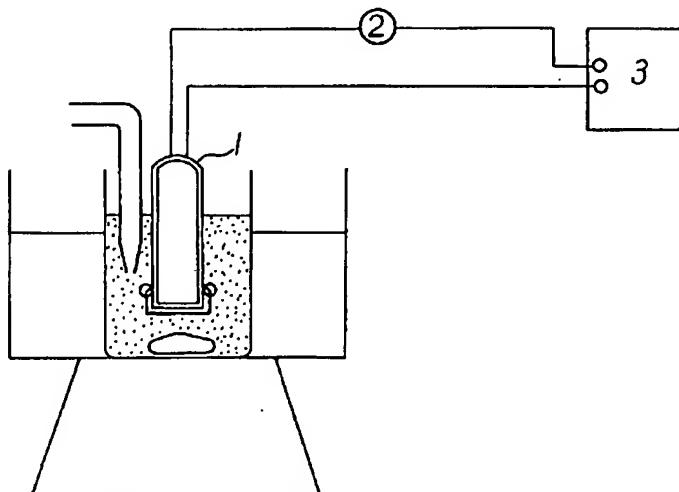
第3図は本発明の微生物電極の応答曲線の一例を

示すグラフである。第4図は本発明の微生物電極を用いて測定した標準溶液の電流値とBODとの関係を示すグラフである。第5図は本発明の微生物電極の再使用性を示すグラフである。第6図は本発明の微生物電極を用いて測定したアルコール工場排水の電流値とBODとの関係を示すグラフである。第7図は同じく、と殺場排水の電流値とBODとの関係を示すグラフである。第8図は同じく、食品工場排水の電流値とBODとの関係を示すグラフである。

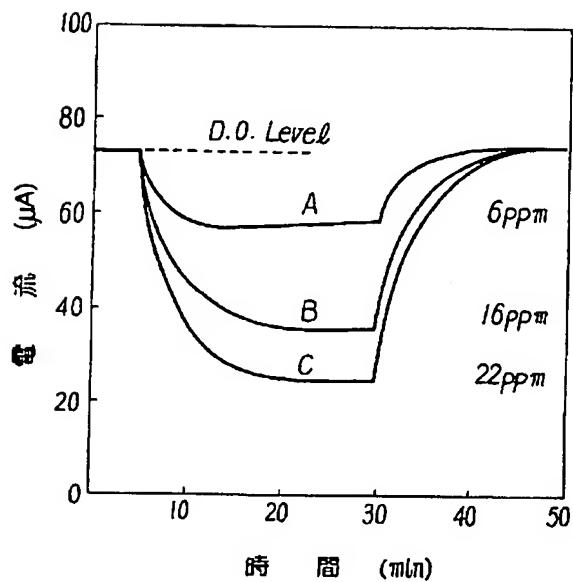
第1図



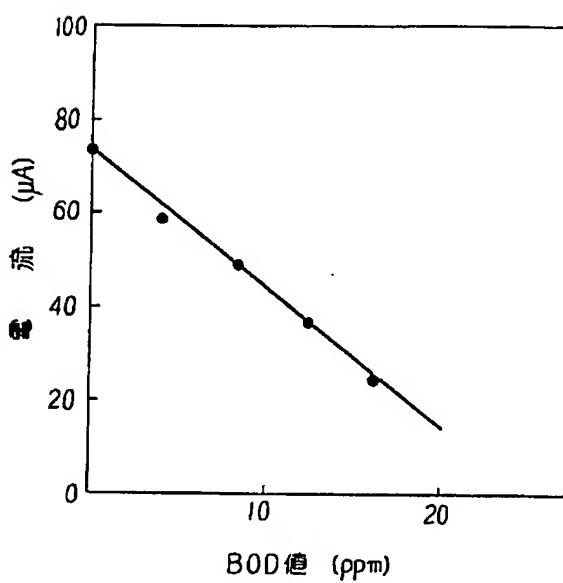
第2図



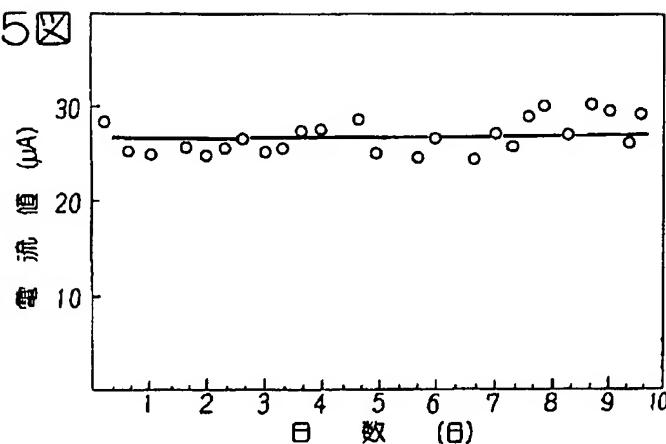
第3図



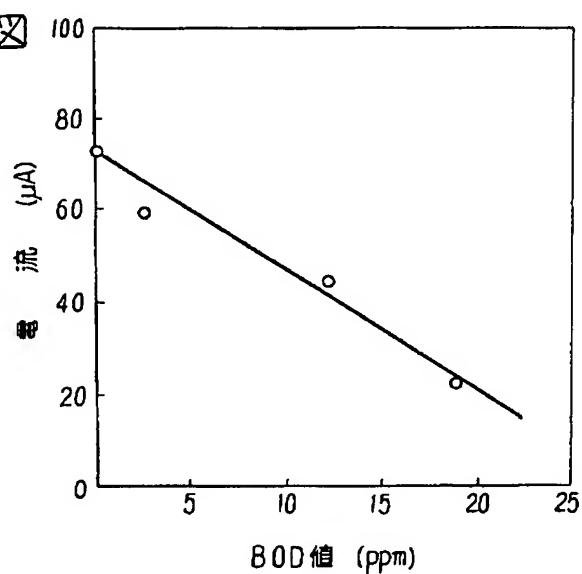
第4図



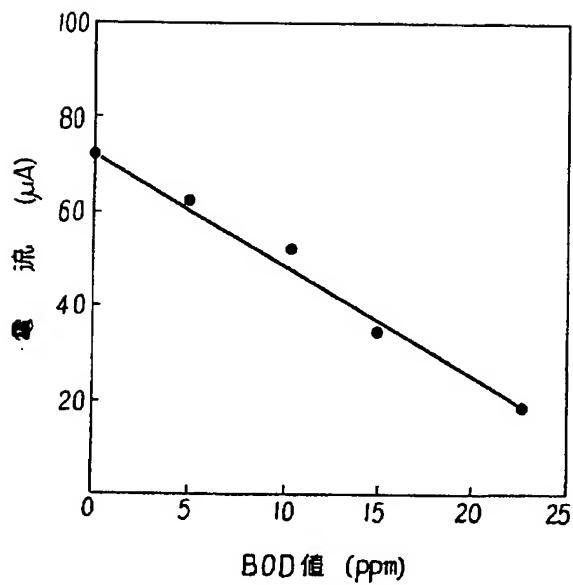
第5図



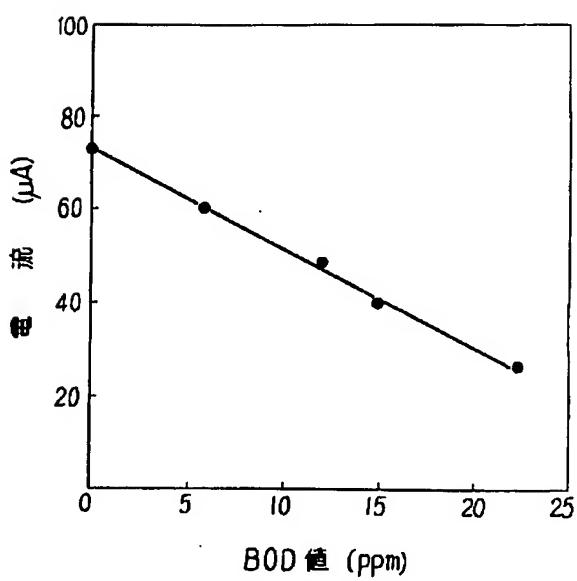
第6図



第7図



第8図



Translation of Japanese Reference

METHOD FOR MEASURING BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND

5 Claims

1. A method for measuring biochemical oxygen demand comprising:
measuring a decreased amount of dissolved oxygen by contacting a microorganism electrode with a test solution, and
determining the biochemical oxygen demand using a proportional relationship between
10 the decreased amount of dissolved oxygen and the biochemical oxygen demand,
wherein the microorganism electrode comprises a microorganism-immobilized membrane placed on a separating membrane of an oxygen electrode, and wherein the microorganism-immobilized membrane is obtained by immobilizing a microorganism that catabolizes organic materials and consumes oxygen on a membranous carrier so as to maintain
15 its physiological activity.

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to a method for determining biochemical oxygen demand (herein after abbreviated as BOD) in very simple manner. More specifically, the invention
20 relates to a simple method for determining the BOD level in which a microorganism electrode comprising an immobilized microorganism that catabolizes organic materials and consumes oxygen placed on a separating membrane of an oxygen electrode is immersed in wastewater (test solution), and the decrease in the amount of dissolved oxygen is determined from the measured electric current (or voltage).

25 Recently, with the rapid expansion of a wide variety of industries, environmental pollution caused by the wastewaters from those industrial plants has become a serious problem to our society. Accordingly, in April, 1970, "the environmental standard regarding water pollution" was approved by the Japanese Cabinet, and among a variety of items regarding the water quality related to environmental pollution of rivers, lakes, and the like, the measurement of
30 BOD, which is one of the indicators for general pollution, became an important item as the wastewater standard.

Currently, the method for measuring BOD is defined in detail by the Japanese Industrial Standards (the method for testing industrial wastewater: JISK0102-1972). However, this method requires to maintain wastewaters at 20°C undisturbed for 5 days before measuring the
35 decrease in the amount of dissolved oxygen, and thus, it takes five days to determine whether the wastewaters are within the standard, and until then, the wastewaters must be stored under a strict

control. In addition, the range of the BOD level measurable by the method is very narrow, and dilution of the original water is troublesome. Furthermore, to improve the preciseness of the measurement, the person who conducts the measurement needs skills. Moreover, the measurement employs a batch method, which makes its automation impossible. Therefore, this
5 method is extraordinarily cumbersome and has numerous drawbacks.

Improved devices have been designed aiming at automation (PPM Vol. 2, No. 8, Nihon Kogyo Shimbun, pp.14-25). However, with these devices, it still takes more than half a day for the measurement, and at each measurement, a certain amount of microorganisms has to be inoculated to the original wastewater. Thus, the improved method has still a drawback of being
10 cumbersome.

The present inventors conducted a variety of studies to make this cumbersome and defective BOD measurement simple and easy. As a result, they found a correlation between the level of BOD and the decrease in the amount of dissolved oxygen in wastewater when the wastewater was contacted with a microorganism electrode, which comprises a
15 microorganism-immobilized membrane, in which a microorganism is immobilized in a form of membrane, placed on an oxygen electrode, and thus completed the present invention.

Thus, the present invention provides methods for determining BOD, comprising measuring a decreased amount of dissolved oxygen by contacting a microorganism electrode with a test solution, and determining the biochemical oxygen demand using a proportional
20 relationship between the decreased amount of dissolved oxygen and the biochemical oxygen demand, wherein the microorganism electrode comprises a microorganism-immobilized membrane placed on a separating membrane of an oxygen electrode, and wherein the microorganism-immobilized membrane is obtained by immobilizing a microorganism that catabolizes organic materials and consumes oxygen on a membranous carrier so as to maintain
25 its physiological activity.

The microorganism electrode of the present invention, *i.e.* BOD-measuring device, can determine the BOD level in sample waters in extremely short time such as within 30 minutes, and can measure a wide range of BOD level. In addition, the measured values are highly reproducible and precise. Moreover, since the microorganism is immobilized, the device is
30 very stable, eliminating the need for microorganism inoculation at each measurement, and can be used repeatedly for long time. Thus, the device has not only many greater advantages compared to the conventional methods, but also is amenable for automated operation. Therefore, the industrial impact of the device should be substantial in actual use.

The microorganism used in the present invention is selected from a group of
35 microorganisms that are able to catabolize organic materials and consume oxygen. Microorganisms used include aerobic microorganisms having the above ability such as bacteria,

fungi, actinomycetes, or the like. Examples of bacteria include *Pseudomonas fluorescence*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*; examples of fungi include *Aspergillus niger*, and *Rhizopus formosaensis*; and examples of actinomycetes include *Streptomyces griseus*. These are, however, merely examples, and generally, mixed microorganisms obtained from soil, activated sludge, or the like may be used.

The microorganisms are cultured in media suitable for their growth, harvested at the exponential growth phase where the viability of those microorganisms is very high, washed and then resuspended in physiological saline or the like, and then immobilized. The microorganisms are immobilized in a form of membrane using a well-known immobilizing agent such as polyacrylamide, collagen, and the like according to the known methods. The immobilized microorganisms are placed on the membrane of the oxygen electrode.

Fig. 1 shows an example of the microorganism electrode of the present invention. The numbers indicate as follows: 1. microorganism-immobilized membrane; 2. Teflon (registered trade mark) membrane (the separating membrane of the oxygen electrode); 3. platinum cathode; 4. lead anode; and 5. electrolyte of potassium hydroxide.

Fig. 2 shows an example of the system for determining BOD using the microorganism electrode of the present invention. 1. Microorganism electrode; 2. amplifier circuit for the electric current; and 3. recorder. The organic material content in wastewaters is determined from the electric current value measured by the above device. Since the system shown in Fig. 2 exemplifies the principle of the method for determining BOD in the present invention, the actual measurement device may be simplified and made portable, and thus, the configuration may be substantially modified.

In the determination of BOD level using the device of the present invention, the organic materials in wastewater are brought in contact with the immobilized microorganism, and catabolized by the microorganism, and thereby oxygen is consumed.

BOD level is determined in a saturated oxygen condition as a sample wastewater is continuously aerated (Fig. 1). When the above microorganism electrode is immersed into wastewater, organic materials in the wastewater are catabolized by the immobilized microorganism, causing a decrease in the oxygen near the microorganism, and thereby leading to a gradual decrease in the electric current. Because the oxygen consumption by the immobilized microorganism is dependent on the concentration of organic materials in the wastewater and is constant, there is a balance established between the diffusion of oxygen from wastewater and the consumption of oxygen by the immobilized microorganism, and thereby, a constant electric current is obtained. Therefore, if the correlation between the decrease in the electric current or the balanced electric current and BOD is determined in advance using standard solutions, the BOD level in sample wastewater can be calculated by comparing the BOD with the electric

current value measured by the above device.

Next, the present invention will be explained with reference to the Test Examples.

[Test Example 1]

5 Ten ml of soil extract obtained according to the method defined by the Japanese Industrial Standard (JIS K0102-1974) was added to 80 ml of medium composed of 1% glucose, 1% peptone, and 1% meat extract, cultured with aeration at 30°C for 24 hr, and then harvested by centrifugation. One gram of wet microorganism was mixed with 100 g of 1% collagen fibril suspension (pH 4.0), casted onto a Teflon plate, and dried at 20°C. The dried
10 microorganism-containing collagen membrane was immersed in 0.1% glutaraldehyde for 1 min to tan, and dried again. This microorganism-containing membrane was cut into 5 cm² and then immobilized on the Teflon plate of the oxygen electrode with rubber bands to make a microorganism-immobilized electrode (BOD-measuring device). This
15 microorganism-immobilized electrode is dipped into solutions to be measured, and the electric current (balanced electric current) is read to determine the BOD level of the solution.
Measurement time was examined using the above BOD-measuring device. The glucose-glutamate standard solution, which is defined as standard wastewater by JIS (150 mg glucose and 150 mg glutamate dissolved in 1 liter of water), was used. This was diluted to prepare solutions with the BOD levels of 6, 16, and 22 ppm, and each concentration was
20 measured. The results are shown in Fig. 3.

In Fig. 3, A, B, and C show the electric currents for the BOD levels of 6, 16, and 22 ppm, respectively. The results indicate that the electric currents for the BOD levels from 6 to 22 ppm reached a constant level within 20 min, indicating that wide range of BOD can be determined within 20 min.

25

[Test Example 2]

The balanced electric currents measured by the device made in Test Example 1 were compared with the BOD levels according to JIS. The standard water used in Test Example 1 were diluted to various concentrations and used as standard wastewaters. Fig. 4 shows the
30 correlation between the balanced electric current and BOD. There was clearly a proportional relationship between the electric current values measured by the device of the present invention and the BOD levels determined by the conventional method, indicating that the device of the present invention, like the conventional method, can be used for determining BOD.

35 [Test Example 3]

The device made in Test Example 1 was used to examine the reusability of the device

for determining BOD. Ten % solution of the standard water was used to measure the BOD level three times a day over 10 days. As shown in Fig. 5, there was no change in the electric current between measurements, indicating that the device can be reused for long time.

5 [Test Example 4]

The preservation stability of the microorganism-immobilized electrode was examined using the device made in Test Example 1. The electrode was immersed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.25 M glucose, and stored at 3°C for 3 months. As shown in Table 1, the determined BOD levels were not much changed, indicating that the preservation stability 10 of the electrode is excellent.

Table 1. Preservation stability of microorganism electrode

Day	BOD (ppm)
0	16.5
20	17.0
40	16.7
60	16.2
90	16.0

Sample solution: 10% solution of the standard solution

35°C

15

As shown in the above Test Examples, the BOD-measuring device for the method of the present invention has great advantages compared with the conventional methods in that the device can measure the BOD level of sample wastewater in a very short time of 30 min or less, and can also measure a wide range of BOD, as well as can be automated. Thus, the industrial 20 impact of the device is expected to be substantial.

Next, Examples of the present invention are described below.

[Example 1]

Five ml of soil extract was added to 100 ml of medium composed of 1% glucose, 1% 25 peptone, and 1% meat extract, and cultured at 30°C for 24 hr with aeration. Wet microorganisms harvested by centrifugation, and 2 g of them was mixed with 100 g of 1% collagen fibril solution (pH 4.0), spread onto a Teflon plate, and dried. This microorganism-containing collagen membrane was immersed in 0.1% glutaraldehyde solution for 2 min, and then dried. The membrane was cut into 4 cm x 4 cm pieces and then 30 immobilized on the separating membrane of the oxygen electrode to make a microorganism

electrode. The electrode was immersed in wastewater from an alcohol fermentation factory, the electric current was read after 30 min, and its correlation with the BOD level determined by the method according to JIS was examined. The results shown in Fig. 6 clearly indicate that there is a proportional relationship between the electric current measured by the device of the present invention and the BOD level determined by the method of JIS, and that the BOD level can be calculated from the measured electric current. Moreover, the relationship between the electric current and BOD of the wastewater was in very good agreement with the relationship between the electric current and BOD of the standard solution obtained in Test Example 2.

10 [Example 2]

One ml of extract of activated sludge from the wastewater plant of a slaughterhouse was cultured in 500 ml of medium composed of 1% glucose, 1% peptone, and 1% meat extract at 37°C for 24 hr with aeration. Microorganism was harvested by centrifugation, and resuspended in 1 ml of physiological saline. 90 mg of acrylamide monomer and 10 mg of N, 15 N'-methylene-bis-acrylamide monomer were added to 1ml of the microorganism suspension. Potassium persulfate was added and polymerized at 20°C on a Teflon plate to prepare a microorganism-containing polyacrylamide membrane. The acrylamide membrane was reinforced by covering it with 4 cm x 4 cm of women's nylon stockings, and immobilized on the separating membrane of the oxygen electrode with rubber bands to make a device shown in Fig. 20 1. The device was used for measuring actual wastewater from a slaughterhouse. The results shown in Fig. 7 indicate that there was a proportional relationship between the electric current measured by the device and the BOD level determined by the method of JIS, and that the BOD level can be determined by measuring the electric current using the device.

25 [Example 3]

The BOD level of wastewater from a food factory was measured using the same device as described in Example 1, and compared with the BOD level determined by the method defined by JIS. The results shown in Fig. 8 indicate that there was clearly a proportional relationship between the two values, and that the BOD level of actual wastewater can be determined simply 30 by measuring the electric current.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 illustrates an example of the microorganism electrode of the present invention.

Fig. 2 illustrates an example of the BOD-measuring system using the microorganism 35 electrode of the present invention.

Fig. 3 is a graph showing a response curve of the microorganism electrode of the present

invention.

Fig. 4 is a graph showing the relationship between the electric current measured for the standard solution using the microorganism electrode of the present invention and the BOD level.

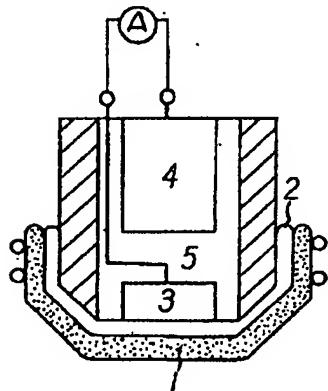
Fig. 5 is a graph showing the reusability of the microorganism electrode of the present invention.

Fig. 6 is a graph showing the relationship between the electric current measured for wastewater from an alcohol fermentation factory using the microorganism electrode of the present invention and the BOD level of the wastewater.

Fig. 7 is a graph showing the relationship between the electric current and the BOD level of wastewater from a slaughterhouse.

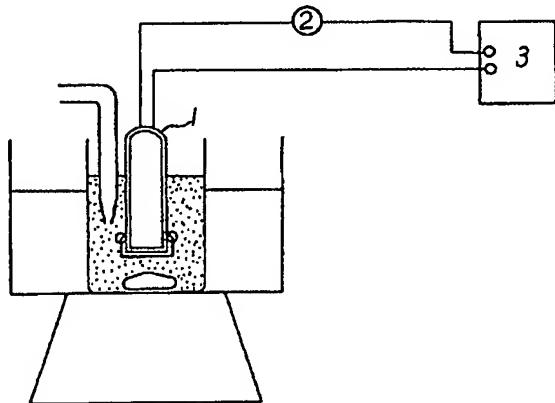
Fig. 8 is a graph showing the relationship between the electric current and the BOD level of wastewater from a food factory.

[Fig. 1]

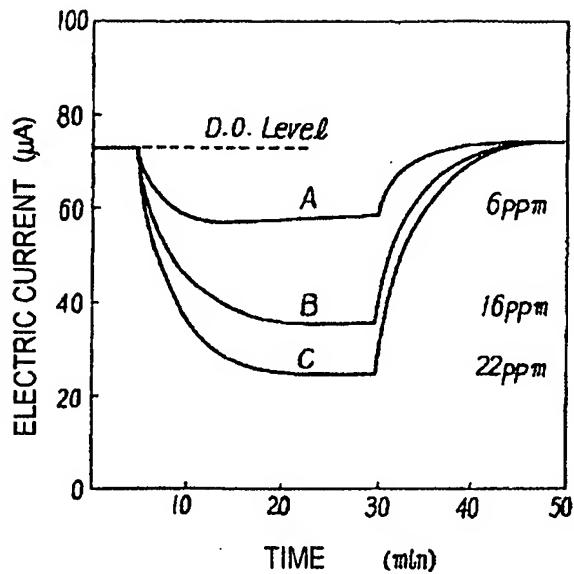


15

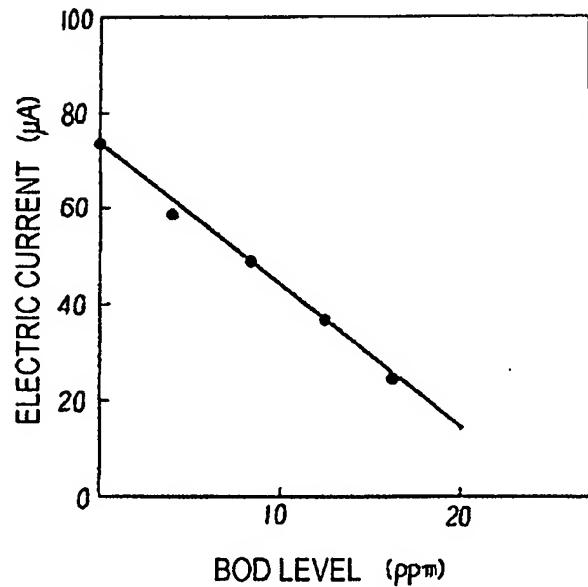
[Fig. 2]



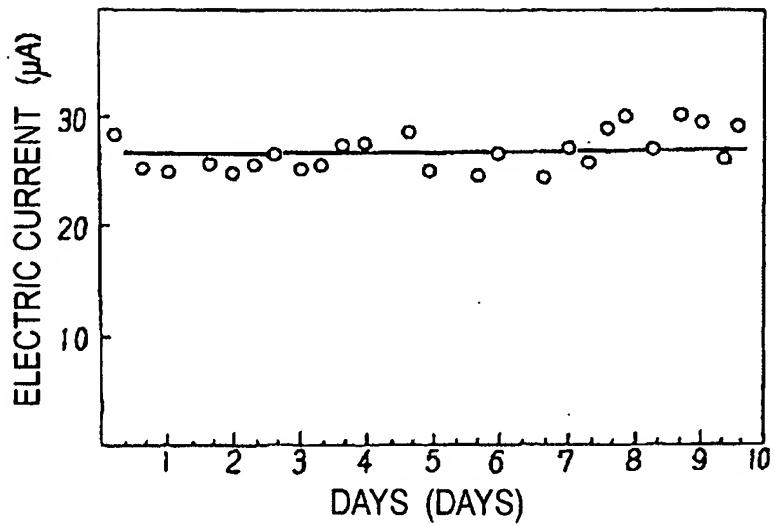
[Fig. 3]



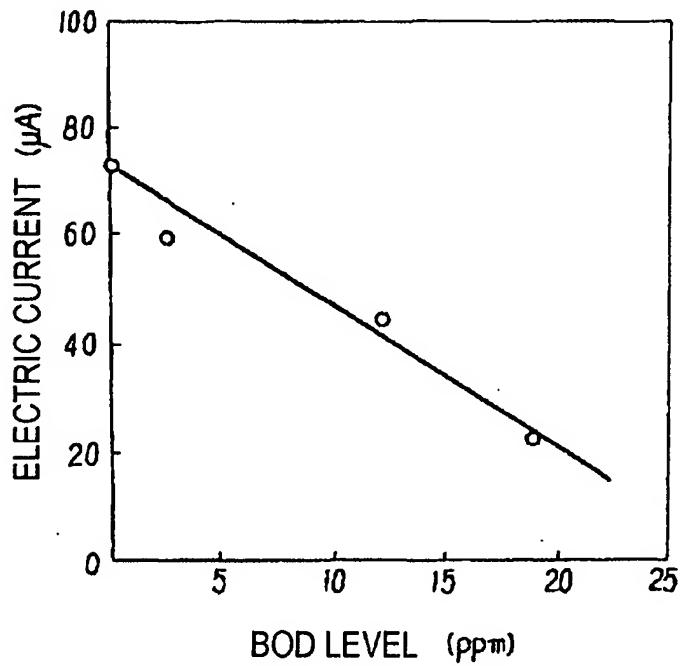
[Fig. 4]



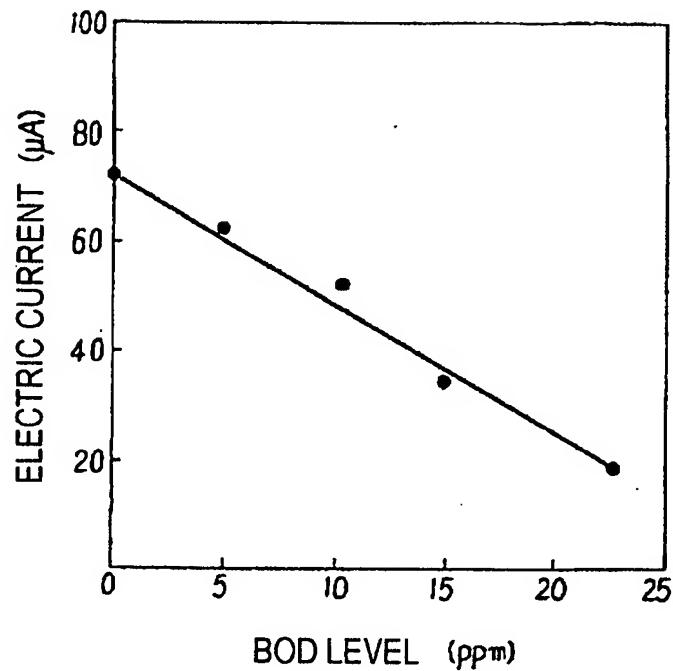
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

